



BOZO RESEARCH
CENTER INC.

最終報告書

ピグメントエロー-14 の哺乳類の培養細胞を用いた染色体異常試験

M-1098

株式会社 **ボソリサーチセンター**

東京本部 〒151-0065 東京都渋谷区大山町36-7
本社・東京研究所 〒156-0042 東京都世田谷区羽根木1-3-11
御殿場研究所 〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284
函南研究所 〒419-0101 静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。

試験責任者陳述書

試験番号 : M-1098

試験表題 : ビグメントエロー-14 の哺乳類の培養細胞を用いた染色体異常試験

本試験は以下に示す基準に準拠して実施したものであります。

- ・ “OECD Principles of Good Laboratory Practice” (as revised in 1997)



信頼性保証陳述書

試験番号 : M-1098

試験表題 : ビグメントエロー-14 の哺乳類の培養細胞を用いた染色体異常試験

本試験は以下に示す基準に準拠して実施されたことを保証致します。

- ・ “OECD Principles of Good Laboratory Practice” (as revised in 1997)

調査日及び報告日

調 査 の 対 象	調 査 日	試験責任者及び運営管理者への報告日
試験計画書	2000 年 12 月 7 日	2000 年 12 月 8 日
細胞増殖抑制試験 (計測)	2000 年 12 月 14 日	2000 年 12 月 15 日
被験物質調製指示シート	2001 年 1 月 12 日	2001 年 1 月 12 日
細胞播種	2001 年 1 月 15 日	2001 年 1 月 16 日
被験物質 (調製・保存)	2001 年 1 月 18 日	2001 年 1 月 19 日
被験物質処理	2001 年 1 月 18 日	2001 年 1 月 19 日
固定	2001 年 1 月 19 日	2001 年 1 月 20 日
染色	2001 年 1 月 22 日	2001 年 1 月 22 日
染色体標本観察	2001 年 1 月 30 日	2001 年 1 月 31 日
染色体標本観察	2001 年 2 月 23 日	2001 年 2 月 24 日
生データ・図・表	2001 年 3 月 29 日	2001 年 3 月 29 日
最終報告書草案	2001 年 3 月 29 日	2001 年 3 月 29 日
再調査	2001 年 3 月 30 日	2001 年 3 月 30 日
試験計画書変更書 (1)	2001 年 4 月 5 日	2001 年 4 月 6 日
生データ	2001 年 5 月 29 日	2001 年 5 月 30 日
再調査	2001 年 5 月 30 日	2001 年 5 月 30 日
最終報告書	2001 年 6 月 14 日	2001 年 6 月 14 日

目 次

	頁
目 次	1
試験実施概要	3
試験従事者一覧	5
要 約	6
緒 言	8
試験材料及び方法	
1. 被験物質及び対照物質	9
1-1. 被験物質及び媒体	9
1-2. 被験液の調製	9
1-3. 対照物質	11
2. 使用細胞株	12
3. 試 葉	14
4. 試験方法	15
4-1. 識別方法	15
4-2. 細胞増殖抑制試験	16
4-3. 染色体異常試験	17
4-4. 追加確認試験	19
4-5. 標本の観察	19
5. 判定基準	20
6. 統計解析	20

	頁
試験結果	21
考 察	25
参考文献	26
Attached Data	
Attached Data 1 Background Data of the Testing Facility	27
Figures and Tables	
Short-term Treatment with Metabolic Activation	
Figure 1 Results of Short-term Treatment with Metabolic Activation	28
Table 1-1 Cell Growth Inhibition Ratio <with S9 mix, 6h treatment>	29
Table 1-2 Results of Chromosomal Aberration Study < with S9 mix, 6h treatment >	30
Short-term Treatment without Metabolic Activation	
Figure 2 Results of Short-term Treatment without Metabolic Activation	31
Table 2-1 Cell Growth Inhibition Ratio < without S9 mix, 6h treatment >	32
Table 2-2 Results of Chromosomal Aberration Study < without S9 mix, 6h treatment >	33
24-hour Continuous Treatment	
Figure 3 Results of 24-hour Continuous Treatment	34
Table 3-1 Cell Growth Inhibition Ratio < without S9 mix, 24h treatment >	35
Table 3-2 Results of Chromosomal Aberration Study < without S9 mix, 24h treatment >	36
48-hour Continuous Treatment	
Figure 4 Results of 48-hour Continuous Treatment	37
Table 4-1 Cell Growth Inhibition Ratio < without S9 mix, 48h treatment >	38
Table 4-2 Results of Chromosomal Aberration Study < without S9 mix, 48h treatment >	39

試験実施概要

1. 試験計画書

試験番号 : M-1098
試験表題 : ピグメントエロー-14 の哺乳類の培養細胞を用いた染色体異常試験

2. 試験目的 : 哺乳類の培養細胞（CHL/IU 細胞）を用い、本被験物質の
染色体異常誘発能の有無を明らかにした。

3. 試験委託者 : 経済産業省（旧通商産業省） 製品評価技術センター
〒151-0066 東京都渋谷区西原 2-49-10

4. 試験受託者 : 株式会社ボゾリサーチセンター
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11
[REDACTED]

5. 試験実施施設 : 株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

6. 被験物質

供給者 [REDACTED]
被験物質名 : ピグメントエロー-14
(別名: ペンジジンエロー)
受領日 : 2000 年 9 月 14 日
保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び変異原性試験室

7. 試験日程

試験開始日 : 2000 年 12 月 6 日
実験開始日 : 2000 年 12 月 8 日
細胞増殖抑制試験 : 2000 年 12 月 8 日 ～ 2000 年 12 月 14 日

染色体異常試験

短時間処理法 : 2001 年 1 月 15 日 ~ 2001 年 2 月 5 日
 連続処理法 : 2001 年 2 月 3 日 ~ 2001 年 2 月 26 日
 実験完了日 : 2001 年 2 月 26 日
 試験終了日 : 2001 年 6 月 14 日

8. 試験責任者 :



9. 試験担当者

試験主担当者

統計処理責任者



10. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

本試験に関し、試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因はみられなかった。

11. 資料保存

試験計画書（原本）、記録文書、生データ、報告書類（最終報告書の原本を含む）は、株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所の資料保存施設に保存する。なお、その期間は最終報告書提出後 10 年間とする。期間終了後の保存については、経済産業省 製品評価技術センターと株式会社ボゾリサーチセンター間で協議し、その処置を決定する。ただし、長期保存に耐えられない染色体標本については、最終報告書提出後 3 箇月を経過した時点で廃棄する。

12. 試験責任者の署名又は記名・なつ印



試験従事者一覧

細胞増殖抑制試験

細胞播種：

被験物質処理：

標本作製：

細胞増殖抑制率測定：

染色体異常試験

短時間処理法

細胞播種：

被験物質処理：

標本作製：

標本コード化：

細胞増殖抑制率測定：

染色体標本観察：

統計処理（染色体観察結果集計）：

連続処理法

細胞播種：

被験物質処理：

標本作製：

標本コード化：

細胞増殖抑制率測定：

染色体標本観察：

統計処理（染色体観察結果集計）：

要 約

チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU 細胞）を用いて、ピグメントエロー-14 の染色体異常誘発能の有無を検討した。

第一に細胞増殖抑制試験として、ピグメントエロー-14 の試験細胞に対する増殖抑制の有無を確認し、この結果を基に 50%細胞増殖抑制濃度の概略値を求め、染色体異常試験のための被験液の濃度範囲を設定した。第二に染色体異常試験として、短時間処理法では代謝活性化及び非代謝活性化についてピグメントエロー-14 を 6 時間処理し、次いでピグメントエロー-14 を含む培養液を除去した後に新たな培養液中で 18 時間培養を行い染色体標本を作製し顕微鏡下で観察した。また連続処理法では、ピグメントエロー-14 を 24 時間及び 48 時間連続処理した後に染色体標本を作製し顕微鏡下で観察した。結果の判定は、石館らの方法に従った。なお、判定に際しては統計学的処理を行わなかった。

＜細胞増殖抑制試験＞ ピグメントエロー-14 の 39.1、78.1、156、313、625、1250、2500 及び 5000 $\mu\text{g/mL}$ における細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法及び連続処理法 24 時間処理における 50%細胞増殖抑制濃度はいずれも 5000 $\mu\text{g/mL}$ を上回り、連続処理法 48 時間処理における 50%細胞増殖抑制濃度は、625 $\mu\text{g/mL}$ 程度であることが示された。この結果から染色体異常試験におけるピグメントエロー-14 の濃度は短時間処理法及び連続処理法 24 時間処理ともに 5000 $\mu\text{g/mL}$ を最高濃度として公比 2 で希釈した計 5 濃度(313、625、1250、2500 及び 5000 $\mu\text{g/mL}$)を設定し、連続処理法 48 時間処理は 5000 $\mu\text{g/mL}$ を最高濃度として公比 2 で希釈した計 7 濃度 (78.1、156、313、625、1250、2500 及び 5000 $\mu\text{g/mL}$) を設定し実施した。

＜染色体異常試験＞ 短時間処理法及び連続処理法のいずれの処理方法によっても、ピグメントエロー-14 を処理した全用量群において染色体の構造異常を有する細胞及び倍数性細胞の出現頻度の増加は認められず、また用量依存的な増加も認められなかった。

なお、短時間処理法及び連続処理法のいずれの処理方法においても、染色体の観察を行った 2 枚の培養器(シャーレ)間に異常細胞の出現頻度の著しい相違は認められず、培養条件等の試験環境においても異常は認められなかった。また、陽性対照物質を処理した群においては、顕著な染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度の増加が認められた。これらの結果より試験は適切に実施されたことを確認した。

以上の結果から、ピグメントエロー-14 は本試験条件下において染色体異常誘発能を有さないものと判定した。

緒 言

経済産業省 製品評価技術センターの依頼により、ピグメントエロー-14 の安全性試験の一環として、哺乳類の培養細胞（CHL/IU 細胞）を用いた染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準及びガイドラインに準拠して実施した。

GLP

- ・ “OECD Principles of Good Laboratory Practice” (as revised in 1997)

毒性試験ガイドライン

- ・ “OECD Guidelines for Testing of Chemicals”, No.473, *In vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test (21st July 1997)

試験材料及び方法

1. 被験物質及び対照物質

1-1. 被験物質及び媒体

1-1-1. 被験物質

供給者 : [REDACTED]
被験物質名 : ピグメントエロー-14 (別名: ベンジジンエロー)
CAS 番号 : 5468-75-7
ロット番号 : [REDACTED]
性 状 : やまぶき色粉末
安 定 性 : 冷暗所で安定
保 存 方 法 : 冷暗所 (冷蔵庫内)
保 存 場 所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び変異原性試験室
返 却 : 試験終了後の残量はすべて試験委託者に返却した。

1-1-2. 媒体

名 称 : ジメチルスルホキシド (DMSO)
ロット番号 : SEH4223
製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
保 存 方 法 : 室温
保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

1-2. 被験液の調製

1) 調 製 方 法 : 細胞増殖抑制試験は、無菌的操作によりピグメントエロー-14 を採取し、500 mg/mL (培養液に添加した際の最終濃度: 5000 µg/mL) を最高濃度として DMSO により懸濁し、以下公比 2 で 7 段階希釈した計 8 濃度 (①3.91、②7.81、③15.6、④31.3、⑤62.5、⑥125、⑦250 及び⑧500mg/mL) を調製した。

染色体異常試験は、細胞増殖抑制試験において被験物質の 125 mg/mL 以上の処理群の培養終了時点で結晶の析出が認められたが、この結晶の析出による細胞毒性の発現の用量相関性は認めら

れなかったため染色体異常試験の濃度設定に結晶の析出を考慮せず、また、細胞増殖抑制試験において 50%以上の細胞増殖抑制率を基に最高濃度を設定し、短時間処理法及び連続処理法 24 時間処理においては 500mg/mL(培養液に添加した際の最終濃度：5000 μ g/mL)を最高濃度として公比 2 により希釈した計 5 濃度(①31.3、②62.5、③125、④250 及び⑤500mg/mL)、連続処理法 48 時間処理においては 500mg/mL(培養液に添加した際の最終濃度：5000 μ g/mL)を最高濃度として公比 2 により希釈した計 7 濃度(①7.81、②15.6、③31.3、④62.5、⑤125、⑥250 及び⑦500mg/mL)を設定した。

- 2) 保存方法：被験液は用時調製とし、保存しなかった。
- 3) 安定性：ピグメントエロー-14 に DMSO を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、色調変化は認められなかった。
- 4) 被験物質用量の選択理由：

遺伝毒性試験のガイドラインに準じて被験液の濃度を設定した。
 <細胞増殖抑制試験>被験物質の 5000 μ g/mL を最高濃度として、DMSO により以下公比 2 で 7 段階希釈した計 8 濃度(①39.1、②78.1、③156、④313、⑤625、⑥1250、⑦2500 及び⑧5000 μ g/mL)とした。

<染色体異常試験>

短時間処理法：細胞増殖抑制試験において被験物質の 1250 μ g/mL 以上の処理群にはシャーレ底面に結晶の析出が認められたが、この濃度域においてさらなる濃度に依存した細胞増殖抑制の増強は認められなかったため、染色体異常試験の濃度設定に結晶の析出を考慮しなかった。細胞増殖抑制試験において得られた 50%細胞増殖抑制濃度を基に、観察対象となる染色体標本の作製は不可能であることが危惧されるが細胞毒性の発現濃度域における染色体構造異常誘発能の確認を目的として 50%を越える細胞増殖抑制率の明らかな発現が予測される 5000 μ g/mL を染色体異常試験短時間処理法の最高濃度として設定し、DMSO により公比 2 で希釈した計 5 濃度(①313、②625、③1250、④2500 及び⑤5000 μ g/mL)

を設定した。

連続処理法：連続処理法 24 時間処理では短時間処理法と同様の理由により 5000 μ g/mL を最高濃度として設定した。なお、連続処理法 48 時間処理では、細胞毒性の発現の程度によっては観察対象となる染色体標本の作製は不可能であることが危惧されるが細胞毒性の発現濃度域における染色体構造異常誘発能の確認を目的として 625、1250、2500 及び 5000 μ g/mL、用量反応性の確認を目的として観察対象となる染色体標本の作製が可能と考えられる 78.1、156、313 μ g/mL を含み、公比 2 により希釈した計 7 濃度（78.1、156、313、625、1250、2500 及び 5000 μ g/mL）を設定した。

1-3. 対照物質

1) 溶媒対照（陰性対照）

名 称 : DMSO
 ロット番号 : SEH4223
 製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
 保 存 方 法 : 室温
 保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

2) 陽性対照

(1) 短時間処理法

代謝活性化法における既知陽性対照物質のシクロフォスファミドと非代謝活性化法における既知陽性対照物質のマイトマイシンCを用いた。

名 称 : シクロフォスファミド（CP）
 ロット番号 : LEE7264
 製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
 純 度 : 和光特級（97.0%以上）
 保 存 方 法 : 冷蔵、遮光
 保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

名 称 : マイトマイシン C (MMC)
ロット番号 : 287AIH
製 造 元 : 協和醗酵工業株式会社
力 価 : 2mg (力価) / 瓶
保 存 方 法 : 室温、遮光
保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

(2) 連続処理法

非代謝活性化法における既知陽性対照物質のマイトマイシン C を用いた。

名 称 : マイトマイシン C (MMC)
ロット番号 : 287AIH
製 造 元 : 協和醗酵工業株式会社
力 価 : 2mg (力価) / 瓶
保 存 方 法 : 室温、遮光
保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

(3) 調製方法

生理食塩液（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、Lot No.:K8C74）により用時溶解し目的濃度に調製した。

(4) 陽性対照物質の選択理由

毒性試験のガイドラインに準じて選択した。当該陽性対照物質は既知の染色体異常誘発物質であり、水溶性で調製が比較的容易である。

2. 使用細胞株

1) 供試哺乳類培養細胞

チャイニーズハムスターの肺由来線維芽細胞（CHL/IU 細胞）

2) 入手先及び入手年月日

入手先 ヒューマンサイエンス研究資源バンク

入手日 1997 年 10 月 22 日

3) 細胞の選択理由

自然発生の染色体異常発現率が低く、種々の化学物質に対して感受性が高いことから選択した。

4) 染色体構成

入手時の染色体数のモードは 90%が 25 本(n=20)であり、使用細胞の非処理群における染色体数のモードは 91%が 25 本(n=800)であった。

5) 増殖様式

プレート上で単層状に増殖、入手時の情報における細胞倍加時間は 17.6 時間であり、使用細胞における測定値は 17.5 時間であった。

細胞は継代 3 回目(細胞増殖抑制試験)、14 回目(染色体異常試験 短時間処理法)、19 回目(染色体異常試験 連続処理法)に播種した。

6) 培養液

10%仔牛血清 (56℃、30 分、非働化) 含有 Eagle's MEM 培養液

7) 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂濃度 5%、温度 37℃の高温条件下で培養し、3~4 日目に継代した。

8) 細胞の保存

液体窒素タンク (-196℃理論値) 中で保存した。保存に関してはジメチルスルホキシド 10% (DMSO ; JIS 規格試薬特級 99%以上) を培養液に加えた。

3. 試 藥

1) S9

名 称	: S9 (Cofactor C set)
ロット番号	: 00090106
製 造 元	: オリエンタル酵母工業株式会社
製 造 日	: 2000 年 9 月 1 日
購 入 日	: 2000 年 10 月 20 日
種・系 統	: ラット・SD 系
性	: 雄
週 齢	: 7 週齢
体 重	: 216.2±7.6g
誘 導 物 質	: フェノバルビタール (PB) & 5,6-ベンゾフラボン (BF)
投 与 法	: 腹腔内投与

投与期間及び投与量

: PB (1日目 30mg/kg, 2日目以降 60mg/kg を1日1回3日間
腹腔内投与)

BF (3 日目に 80mg/kg の用量で 1 回腹腔内投与)

保存方法 : 冷凍保存 (約 -80°C)

保存場所：御殿場研究所 変異原性試験室

2) Cofactor

名 称	: Cofactor (Cofactor C set)
ロット番号	: C00090804
製 造 元	: オリエンタル酵母工業株式会社
保 存 方 法	: 冷凍保存 (約-80℃)
保 存 場 所	: 御殿場研究所 変異原性試験室

3) S9 mix の組成

S9 2 mL

Cofactor	4.7 mL	20mM HEPES 緩衝液(pH 7.2)	1.34 mL
		50mM 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL

330mM 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
50mM グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL
40mM 酸化型ニコチンアミド-アデニン ジヌクレオチドリリン酸(NADP)水溶液	0.67 mL
精製水	0.67 mL

4) 細胞培養液

10%仔牛血清 (56℃、30 分、非働化) 含有 Eagle's MEM 培養液

仔牛血清

名 称 : Calf serum
 ロット番号 : 1060198
 製 造 元 : Life Technologies inc.
 保 存 方 法 : 冷凍保存
 保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

MEM

名 称 : Minimum Essential Medium(MEM), powder
 ロット番号 : 1062377
 製 造 元 : Life Technologies inc.
 保 存 方 法 : 冷蔵保存
 保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

4. 試験方法¹⁻⁷⁾

4-1. 識別方法

1) 試験方法の識別

試験は以下のステージ順に実施し、識別した。

- | | |
|--------------|----------|
| (1) 細胞増殖抑制試験 | 試験識別 : 1 |
| (2) 染色体異常試験 | |
| 短時間処理法 | 代謝活性化 |
| | 試験識別 : 2 |
| 非代謝活性化 | 試験識別 : 3 |

- | | | | |
|-------------|-------|-----------|--------|
| (3) 染色体異常試験 | 連続処理法 | 24 時間連続処理 | 試験識別：4 |
| | | 48 時間連続処理 | 試験識別：5 |

2) 濃度の識別

(1) 細胞増殖抑制試験

溶媒対照群を「SC」(Solvent Control)、非処理群を「NT」(Non Treatment)とし、被験物質処理群の濃度の低い方から「1」「2」「3」「4」「5」「6」…と番号をつけた。ただし、短時間処理法の代謝活性化した場合は「+」、代謝活性化しない場合は「-」、連続処理法の 24 時間処理の場合は「24-」、48 時間処理の場合は「48-」をそれぞれ番号の前につけた。

(2) 染色体異常試験

被験物質を処理するシャーレは、細胞増殖抑制試験と同様に番号をつけた。ただし、溶媒対照群を「SC」(Solvent Control)、非処理群を「NT」(Non Treatment)、陽性対照群を「PC」(Positive Control)とした。染色体標本(スライド標本、1 シャーレ当たりスライドを 2 枚作製)は、試験番号と染色体観察コード表に従い「01」「02」「03」～「99」までの 2 桁の番号とスライド枝番号「-1」及び「-2」を付けた。

4-2. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の処理濃度を設定するための予備試験（細胞増殖抑制試験）として実施した（試験識別：1）。

1) 短時間処理法

直径 60mm プラスチックシャーレを濃度当たり 2 枚準備し、1 枚当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0mL）を播種し 3 日間培養した後、新たな培養液 5.0mL に交換した。代謝活性化法としてシャーレの細胞培養液 0.883mL を除き、溶媒対照群については溶媒 0.05mL 及び S9 mix 0.833mL を、被験物質処理群については各濃度の被験液 0.05mL 及び S9 mix 0.833mL を加えた。また、非処理群についてはシャーレの細胞培養液 0.833mL を除き S9 mix 0.833mL を加えた。よく混和した後 6 時間培養した。すべての用量群について非代謝活性化法として S9 mix を加えない群、すなわちシャーレの細胞培養液 0.05mL を除き、各濃度の被験液 0.05mL を加え、これを 6 時間培

養する群を設けた。いずれも6時間の培養後、シャーレ内の培養液を除き生理食塩液で細胞表面を洗浄した後、新たな細胞培養液 5.0mL を加え、更に18時間培養を続けた。培養終了後、倒立位相差顕微鏡により細胞増殖状態及び析出の有無、肉眼により培養液色を確認した後にシャーレの細胞培養液を除き生理食塩液で細胞表面を洗浄し、10%ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット溶液で染色した。細胞の染色の濃淡から単層培養細胞密度計（モノセレータ、販売：KS オリンパス株式会社、製造：東洋測器株式会社）を用いて細胞密度を測定した。この際、溶媒対照細胞の値を100%とした。この結果を図示し被験物質の50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

2) 連続処理法

短時間処理法と同様に細胞を播種し3日間培養した後、新たな培養液 5.0mL に交換した。シャーレの細胞培養液 0.05mL を除き、各濃度の被験液 0.05mL を加え、24時間あるいは48時間培養を続けた。短時間処理法と同様に、非処理群及び溶媒対照群を設けた。それぞれ24時間あるいは48時間培養した。短時間処理法と同様に培養終了後に細胞増殖状態、析出の有無、培養液色を確認した後に固定、染色し50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

4-3. 染色体異常試験

濃度当たり4枚のシャーレを用意し、2枚のシャーレにより染色体観察用のスライドガラス標本作製し、残る2枚のシャーレは細胞増殖抑制を確認するため、細胞増殖抑制試験と同様にシャーレを固定、染色し単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。

1) 短時間処理法

<代謝活性化>

直径60mmのプラスチックシャーレ1枚当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0mL）を播種し3日間培養した後、新たな培養液 5.0mL に交換した。細胞培養液 0.883mL を除き、陰性対照として設けた溶媒対照群については溶媒 0.05mL 及び S9 mix 0.833mL を、被験物質処理群については各濃度の被験液 0.05mL 及び S9 mix 0.833mL を加えた。また、非処理群についてはシャーレの細胞培養液 0.833mL を除き S9 mix 0.833mL

を加えた。陽性対照群については細胞培養液 0.933mL を除き、シクロフォスファミド (CP: 15 μ g/mL) 0.1mL 及び S9 mix 0.833mL を加えた。よく混和した後 6 時間培養した (試験識別: 2)。

<非代謝活性化>

代謝活性化と同様に細胞を播種し 3 日間培養した後、新たな培養液 5.0mL に交換した。細胞培養液 0.05mL を除き、陰性対照として設けた溶媒対照群については溶媒 0.05mL を、被験物質処理群については各濃度の被験液 0.05mL を加えた。非処理群についてはシャーレの細胞培養液の交換のみとした。陽性対照群については細胞培養液 0.1mL を除き、マイトマイシン C(MMC: 0.05 μ g/mL) 0.1mL を加えた。よく混和した後 6 時間培養した (試験識別: 3)。

代謝活性化及び非代謝活性化のいずれも 6 時間の培養後、シャーレ内の培養液を除き生理食塩液で細胞を洗浄した後、新たな細胞培養液 5.0mL を加え、更に 18 時間培養を続けた。なお、染色体観察用のスライドガラス標本作製に際しては、細胞分裂を分裂中期で停止させるため標本作製約 2 時間前にコルセミド (最終濃度 0.2 μ g/mL) を加えた。シャーレの培養液を除き、0.25%トリプシン溶液で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で低張処理し、メチルアルコール・酢酸液(3:1)で固定した。また、培養終了後の培養液除去前に倒立位相差顕微鏡によって細胞状態、析出の有無及び培養液の色調を確認した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所点滴下し、染色体観察用スライド標本作製した。標本は各 1 枚のシャーレから 2 枚のスライド標本 (各処理群の 2 枚のシャーレから計 4 枚のスライド標本) を作製した。この後、空気乾燥しギムザ液で染色した。また、各処理群の残る 2 枚のシャーレにより細胞増殖抑制試験に準じ固定・染色し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。

2) 連続処理法

<24 時間処理>

短時間処理法と同じ条件で細胞を培養した。細胞培養液 0.05mL を除き、陰性対照として設けた溶媒対照群については溶媒 0.05mL を、被験物質処理群については各濃度の被験液 0.05mL を加えた。非処理群についてはシャーレの細胞培養液の交換のみと

した。陽性対照群については細胞培養液 0.1mL を除き、マイトマイシン C(MMC : 0.05 μ g/mL) 0.1mL を加えた。よく混和した後 24 時間培養した (試験識別 : 4)。

<48 時間処理>

短時間処理法と同じ条件で細胞を培養した。細胞培養液 0.05mL を除き、陰性対照として設けた溶媒対照群については溶媒 0.05mL を、被験物質処理群については各濃度の被験液 0.05mL を加えた。非処理群についてはシャーレの細胞培養液の交換のみとした。陽性対照群については細胞培養液 0.1mL を除き、マイトマイシン C(MMC : 0.05 μ g/mL) 0.1mL を加えた。よく混和した後 48 時間培養した (試験識別 : 5)。

処理後 24 時間及び 48 時間に倒立位相差顕微鏡によって細胞状態、析出の有無及び培養液の色調を確認し、標本作製した。標本作製は短時間処理法と同条件とした。また、短時間処理法同様、細胞増殖抑制についても測定した。

4-4. 追加確認試験

染色体異常試験の結果、追加確認の必要が認められなかったため実施しなかった。

4-5. 標本の観察

顕微鏡下で各濃度当たり 200 個 (シャーレ当たり 100 個) のよく広がった分裂中期像について構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数体の数も記録した (3 倍体を含めた染色体数 37 本以上を倍数体として記録する)。なお、客観的な観察を行うため染色体標本はすべて盲検法により観察した。

染色体異常の種類は以下のように分類した。ただし、ギャップとは染色体または染色分体の同軸上に断片があるもの (非染色部分が染色分体の同軸上にある) であって、その長さが染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるものと定義した。断片が染色分体の同軸上よりはずれているもの、及び、非染色部位が染色分体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れている場合は切断と定義した。

構造異常

ギャップ	染色分体型(ctg)、染色体型(csg)を含む(g)
染色分体型切断	(ctb)
染色分体型交換	(cte)、四放射状交換など
染色体型切断	(csb)
染色体型交換	(cse)、二動原体染色体、環状染色体など
その他	断片化(frg)、他

数的異常

倍数体	polyploid、endoreduplication
-----	-----------------------------

5. 判定基準

2 個の培養器(シャーレ)間で異常細胞の出現頻度に著しいばらつきがないこと、陰性対照群で異常細胞の出現頻度が 5%未満であること、陽性対照群でギャップ以外の異常細胞の出現頻度が 10%以上であること、被験物質処理群の 3 用量以上における染色体標本の評価が可能であること及び培養条件等試験環境に異常が認められないことを本試験の成立条件とした。

石館らの判定基準^{1,4,6)}に従い、各実験群の異常細胞の出現率に対して以下のような判定基準を設けた。

異常細胞の出現率 (%)	判定基準
5% 未満	陰 性 (－)
5% 以上 10% 未満	疑陽性 (±)
10% 以上	陽 性 (+)

染色体構造異常を有する細胞の出現率はギャップを含む場合(TAG)と含まない場合(TA)について集計し、ギャップを含まない場合について判定した。異常細胞の出現に用量依存性又は再現性が認められた場合を染色体異常誘発能陽性と判定した^{2,4,6)}。

6. 統計解析

統計は染色体観察結果の集計のみとし、統計解析は実施しなかった。

試験結果

1. 細胞増殖抑制試験

1) 短時間処理法

短時間処理法 代謝活性化の結果を Figure 1 及び Table 1-1 に、非代謝活性化の結果を Figure 2 及び Table 2-1 に示した。

(1) 培養終了時の観察結果

細胞培養終了時の倒立位相差顕微鏡による観察において、代謝活性化の有無に関わらず、ピグメントエロー-14 を処理した全用量群について、50%を超える細胞増殖抑制は認められなかった。また、被験物質の 1250 μ g/mL、2500 μ g/mL 及び 5000 μ g/mL 処理群においてシャーレ底面に結晶の析出が認められたが、この濃度域における細胞毒性の発現に明らかな用量相関性は認められなかった。なお、1250 μ g/mL 及び 2500 μ g/mL の処理群の細胞培養液については他の赤～橙赤色に比べわずかに濃橙色を呈したが、これは被験液の色調である黄色によるものであると考えられた。

(2) 50%細胞増殖抑制濃度

ピグメントエロー-14 を処理した全用量群について、50%を越える細胞増殖抑制が認められなかったことから、本試験条件下におけるピグメントエロー-14 の 50%細胞増殖抑制濃度は、代謝活性化及び非代謝活性化のいずれにおいても 5000 μ g/mL を上回ることが示された。

2) 連続処理法

連続処理法 24 時間処理の結果を Figure 3 及び Table 3-1 に、48 時間処理の結果を Figure 4 及び Table 4-1 に示した。

(1) 培養終了時の観察結果

細胞培養終了時の倒立位相差顕微鏡による観察において、ピグメントエロー-14 を処理した用量群について、24 時間処理は 50%を超える細胞増殖抑制は認められなかったが、48 時間処理は 625 μ g/mL 以上の処理群においてシャーレ底面に接着し増殖した細胞の不連続性が認められた。また、被験物質の 1250 μ g/mL、2500 μ g/mL 及び

5000 $\mu\text{g/mL}$ 処理群においてシャーレ底面に結晶の析出が認められたが、この濃度域における細胞毒性の発現に明らかな用量相関性は認められなかった。なお、1250 $\mu\text{g/mL}$ 及び 2500 $\mu\text{g/mL}$ の処理群の細胞培養液については他の赤～橙赤色に比べわずかに濃橙色を呈したが、これは被験液の色調である黄色によるものであると考えられた。

(2) 50%細胞増殖抑制濃度

ピグメントエロー-14 を処理した全用量群について、24 時間処理は 50%を越える細胞増殖抑制が認められなかったことから、本試験条件下におけるピグメントエロー-14 の 50%細胞増殖抑制濃度は、5000 $\mu\text{g/mL}$ を上回ることが示された。また、48 時間処理は 50%細胞増殖抑制を挟む濃度及びそれらの濃度における細胞増殖抑制率は 313 $\mu\text{g/mL}$ の 32%と 625 $\mu\text{g/mL}$ の 50%であった。これら 2 点を結ぶ直線から求めた 48 時間処理における 50%細胞増殖抑制濃度は、625 $\mu\text{g/mL}$ であった。

2. 染色体異常試験

1) 短時間処理法

短時間処理法の結果を Figure 1、2 及び Table 1-1、1-2、2-1、2-2 に示した。

(1) 被験物質処理濃度の設定理由

細胞増殖抑制試験において代謝活性化及び非代謝活性化のいずれの処理方法においても、ピグメントエロー-14 による 50%を越える細胞増殖抑制濃度が認められなかったため、細胞増殖抑制試験において最高濃度として設定した 5000 $\mu\text{g/mL}$ を染色体異常試験短時間処理法 代謝活性化及び非代謝活性化における最高濃度とし、公比 2 で 4 段階希釈した計 5 濃度 (313、625、1250、2500 及び 5000 $\mu\text{g/mL}$) を設定した。

(2) 染色体構造異常の出現

代謝活性化及び非代謝活性化のいずれの処理方法においても、ピグメントエロー-14 を処理した全用量群について、5%を越える染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度の増加は認められず、これらの用量依存的な増加も認められなかった。

(3) 倍数性細胞の出現

代謝活性化及び非代謝活性化のいずれの処理方法においても、ピグメントエロー-14

を処理した全用量群について、5%を越える倍数性細胞の出現頻度の増加は認められず、これらの用量依存的な増加も認められなかった。

2) 連続処理法

連続処理法の結果を Figure 3、4 及び Table 3-1、3-2、4-1、4-2 に示した。

(1) 被験物質処理濃度の設定理由

細胞増殖抑制試験において 24 時間処理方法では、ピグメントエロー-14 による 50% を越える細胞増殖抑制濃度が認められなかったため、細胞増殖抑制試験において最高濃度として設定した 5000 μ g/mL を最高濃度とし、公比 2 で 4 段階希釈した計 5 濃度 (313、625、1250、2500 及び 5000 μ g/mL) を設定した。また、連続処理法 48 時間処理における 50%細胞増殖抑制濃度は、625 μ g/mL 程度であったため、5000 μ g/mL を最高濃度として公比 2 で 6 段階希釈した計 7 濃度 (78.1、156、313、625、1250、2500 及び 5000 μ g/mL) を設定した。

(2) 染色体構造異常の出現

24 時間処理及び 48 時間処理のいずれの処理方法においても、ピグメントエロー-14 を処理した全用量群について、5%を越える染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度の増加は認められず、これらの用量依存的な増加も認められなかった。

(3) 倍数性細胞の出現

24 時間処理及び 48 時間処理のいずれの処理方法においても、ピグメントエロー-14 を処理した全用量群について、5%を越える倍数性細胞の出現頻度の増加は認められず、これらの用量依存的な増加も認められなかった。

3) 試験系の成立条件

染色体の観察を行った 2 枚の培養器 (シャーレ) 間に異常細胞の出現頻度の著しい相違は認められず、培養条件等の試験環境においても異常は認められなかった (Figure 1~4 及び Table 1-1~4-1、1-2~4-2)。

陰性対照群において染色体構造異常の出現頻度は 5%未満であり、陽性対照群において顕著な染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度の増加が認められた (Figure 1~

4 及び Table 1-2、2-2、3-2、4-2)。

染色体観察用のスライド標本と同時に作製したシャーレ標本による細胞増殖抑制率のピグメントエロー-14 の濃度に対する推移は、細胞増殖抑制試験の結果と同様であった (Figure 1～4 及び Table 1-1、2-1、3-1、4-1)。

以上の結果より、本染色体異常試験の短時間処理法及び連続処理法は適切に実施されたものと判断した。

考 察

チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/TU 細胞）を用いて、ピグメントエロー-14 の染色体異常誘発能の有無を検討した。

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法及び連続処理法 24 時間処理において、顕著な細胞増殖抑制能は認められず、これらの処理方法における 50%細胞増殖抑制濃度はいずれも 5000 μ g/mL を上回ることが示された。連続処理法 48 時間処理においては、50%細胞増殖抑制濃度は、625 μ g/mL 程度であることが示された。また、被験物質の 1250 μ g/mL 以上の処理群においてシャーレ底面に結晶の析出が認められたが、この濃度域における細胞毒性の発現に明らかな用量相関性は認められなかった。これらの結果から染色体異常試験におけるピグメントエロー-14 の濃度は短時間処理法及び連続処理法 24 時間処理ともに 5000 μ g/mL を最高濃度とし、公比 2 で希釈した計 5 濃度(313、625、1250、2500 及び 5000 μ g/mL)を設定し実施した。また、連続処理法 48 時間処理は、5000 μ g/mL を最高濃度とし、公比 2 で希釈した計 7 濃度(78.1、156、313、625、1250、2500 及び 5000 μ g/mL)を設定し実施した。

染色体異常試験の結果、いずれの処理方法においても、ピグメントエロー-14 を処理した全用量群において染色体の構造異常を有する細胞及び、倍数性細胞の 5%を越える出現頻度の増加は認められず、また用量依存的な増加も認められなかった。

またこのとき、2 枚の培養器(シャーレ)間における異常細胞の出現頻度の著しい相違は認められず、培養条件等の試験環境においても異常は認められなかったこと、陰性対照群における染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度はいずれの処理方法においても 5%未満であり、非処理群との明らかな差が認められなかったこと、陽性対照物質を処理した群において顕著な染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度の増加が認められ、また、試験実施施設における背景データとの比較において異常と考えられる数値を認められなかったことなどから試験は適切に実施されたことを確認した。

以上の結果から、ピグメントエロー-14 は本試験条件下において染色体異常誘発能を有さないものと判定した。

参考文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S.: Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro – A screening for chemical carcinogens, *Mutation Res.*, 48, 337-354(1977)
- 2) Matsuoka, A., et al.: Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro, *Mutation Res.*, 66, 277-290(1979)
- 3) 石館 基：哺乳動物細胞を用いる検索と問題点(Screening Trial to Detect Possible Chemical Mutagens and/or Carcinogens in the Environment - Mammalian Cell Systems), *日本化粧品科学会誌*, 6, 31-43(1982)
- 4) 石館基監修：染色体異常試験データ集, 株式会社エル・アイ・シー (1987)
- 5) M. Ishidate, Jr., Edited by G. Obe and A. T. Natarajan: Chromosomal Aberrations Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-271(1989)
- 6) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会 変異原性試験検討グループ編集：厚生省医薬品毒性試験法ガイドラインに基づく変異原性試験 Q&A、サイエンティスト社、1992
- 7) Toshio Sofuni: *IN VITRO DETECTION OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS*, *In Vitro Methods of Toxicology*, CRC Press, 203-216(1992)

Attached Data 1

Background Data of the Testing Facility

Background data of Chromosomal Aberration Tests in CHL/IU cells, based on 5 studies carried out under the same conditions at Bozo Research Center Inc.

Period: July 2000 - October 2000												
Treatment	Cells	Polyploidy	Number of aberration								TA	TAG
S9 mix	Time observed	cells(%)	g	ctb	cte	frg	csb	cse	other			
NT	+	1000	(1)	(0)	(1)	(5)	(0)	(0)	(0)	(0)	(5)	(5)
		%	0.1	0.0	0.1	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5
		Min %	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		Max %	0.5	0.0	0.5	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0
	-	1000	(1)	(0)	(3)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(3)	(3)
		%	0.1	0.0	0.3	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.3
		Min %	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		Max %	0.5	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5
	-	1000	(1)	(0)	(2)	(4)	(0)	(0)	(0)	(0)	(5)	(5)
		%	0.1	0.0	0.2	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5
		Min %	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		Max %	0.5	0.0	0.5	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0
SC	+	1000	(0)	(0)	(2)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)
		%	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2
		Min %	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		Max %	0.0	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5
	-	1000	(1)	(0)	(3)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(4)	(4)
		%	0.1	0.0	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.4
		Min %	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		Max %	0.5	0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	1.5
	-	1000	(0)	(0)	(3)	(3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(4)	(4)
		%	0.0	0.0	0.3	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.4
		Min %	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		Max %	0.0	0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0
PC	+	1000	(0)	(0)	(4)	(3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(4)	(4)
		%	0.0	0.0	0.4	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.4
		Min %	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		Max %	0.0	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5
	-	1000	(1)	(0)	(4)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(4)	(4)
		%	0.1	0.0	0.4	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.4
		Min %	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		Max %	0.5	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5
Control (NT&SC)	+	8000	(5)	(0)	(22)	(21)	(0)	(0)	(0)	(0)	(31)	(31)
		%	0.1	0.0	0.3	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.4
		Min %	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		Max %	0.5	0.0	0.3	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.4
	-	1000	(1)	(0)	(260)	(442)	(0)	(2)	(0)	(0)	(468)	(468)
		%	0.1	0.0	26.0	44.2	0.0	0.2	0.0	0.0	46.8	46.8
		Min %	0.0	0.0	22.0	38.5	0.0	0.0	0.0	0.0	42.0	42.0
		Max %	0.5	0.0	31.5	47.0	0.0	0.5	0.0	0.0	49.5	49.5
	-	1000	(2)	(2)	(175)	(333)	(0)	(0)	(0)	(0)	(356)	(356)
		%	0.2	0.2	17.5	33.3	0.0	0.0	0.0	0.0	35.6	35.6
		Min %	0.0	0.0	16.0	32.0	0.0	0.0	0.0	0.0	33.5	33.5
		Max %	0.5	1.0	19.5	36.0	0.0	0.0	0.0	0.0	37.0	37.0
PC	+	1000	(0)	(1)	(248)	(418)	(1)	(2)	(0)	(1)	(431)	(431)
		%	0.0	0.1	24.8	41.8	0.1	0.2	0.0	0.1	43.1	43.1
		Min %	0.0	0.0	22.0	38.5	0.0	0.0	0.0	0.0	39.5	39.5
		Max %	0.0	0.5	27.5	45.0	0.5	0.5	0.0	0.5	46.5	46.5
	-	1000	(0)	(1)	(283)	(467)	(0)	(2)	(0)	(0)	(479)	(479)
		%	0.0	0.1	28.3	46.7	0.0	0.2	0.0	0.0	47.9	47.9
		Min %	0.0	0.0	23.5	44.5	0.0	0.0	0.0	0.0	46.0	46.0
		Max %	0.0	0.5	35.5	49.5	0.0	0.5	0.0	0.0	50.0	50.0

Time: Treatment hours · Hours of incubation without test article (): number of observed.

NT: Non treatment +: Treatment with metabolic activation

SC: Solvent Control -: Treatment without metabolic activation

PC: Positive Control

Max% and Min%: Maximum and minimum of the total data where in each group was taken into consideration

S9 mix: without metabolic activation (-); with metabolic activation (+)

TA: number of cells with aberrations excluding gaps

TAG: total number of cells aberrations including gaps

Solvent Control (SC): physiological saline, water for injection or dimethylsulfoxide (DMSO)

(solvent used for dissolution, suspension or dilution of the test article)

Positive Control (PC): MMC: Mitomycin C, 0.05 μ g/mL (used for without metabolic activation method)

CP: Cyclophosphamide, 15 μ g/mL (used for with metabolic activation method)

Aberration g: gap(chromatid gap and/or chromosomal gap)

ctb: chromatid break csb: chromosomal break

cte: chromatid exchange cse: chromosomal exchange

frg: fragmentation other: other

CODE: 0006

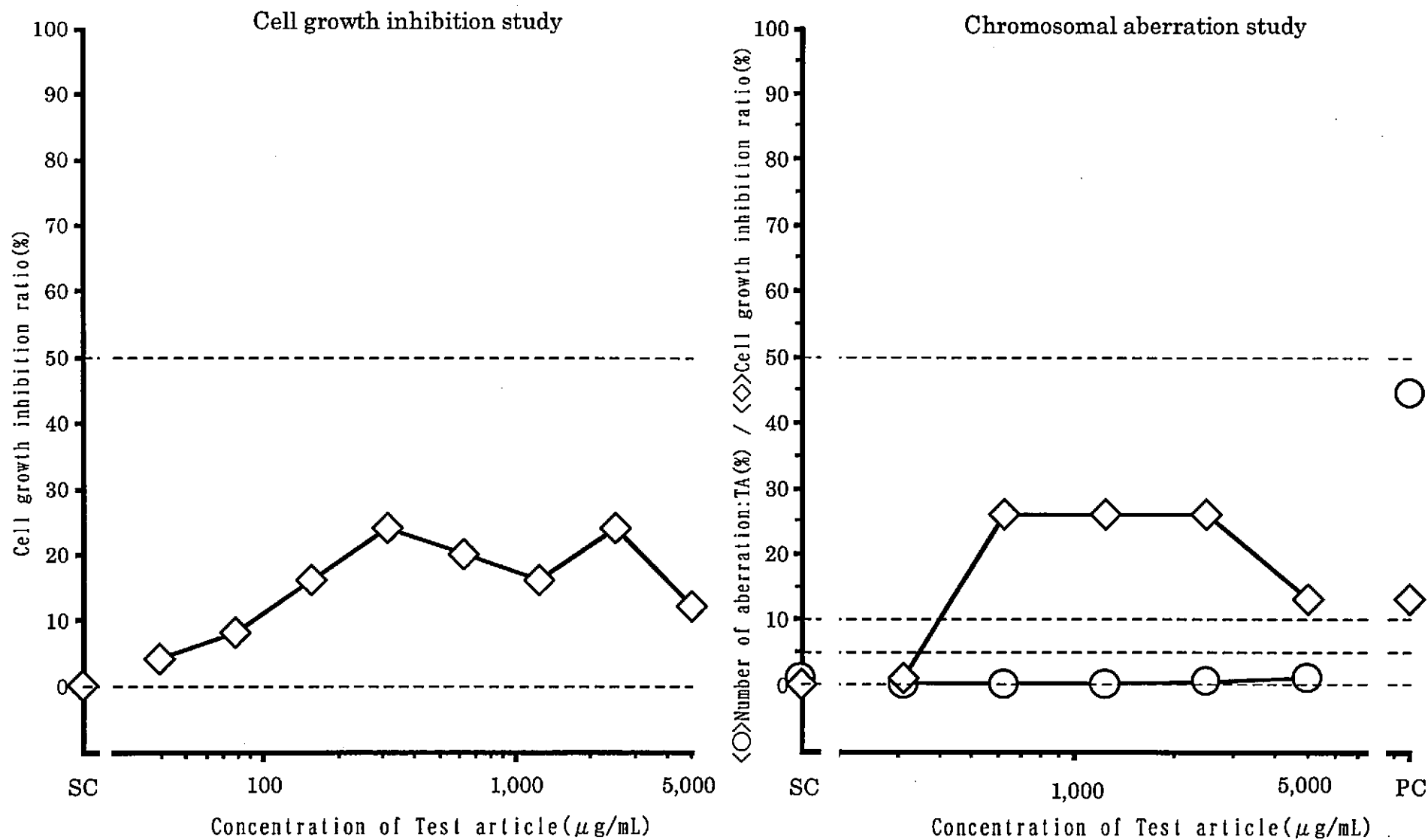


Figure 1 Results of Short-term Treatment with Metabolic Activation

Table 1-1 Cell Growth Inhibition Ratio <+ 6-18>

Study type		Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell growth inhibition study (Results are shown in the left panel of Figure 1)					Chromosomal aberration study (Results are shown in the right panel of Figure 1)						
S9 mix	Time (h)		Measured value		Observation			Measured value		Observation				
			Plate 1 and 2	Mean	Condition of cells ^(a)	Color of medium ^(c)	Precipitates /Crystals ^(d)	Inhibition ratio (%)	Plate 1 and 2	Mean	Condition of cells ^(a)	Color of medium ^(c)	Precipitates /Crystals ^(d)	Inhibition ratio (%)
+ 6-18	Test article	NT	99	99	—	Red	—	—	99	99	—	Red	—	—
		99		—	Red	—	—	99		—	Red	—	—	
		0 (SC)	100 ^(b)	100	—	Red	—	—	100 ^(b)	100	—	Red	—	—
		99		—	Red	—	—	99		—	Red	—	—	
		39.1	99	96	—	Red	—	4	/					
		92		—	Red	—								
		78.1	92	92	—	Red	—	8						
		92		—	Red	—								
		156	84	84	—	Red	—	16						
		84		—	Red	—								
		313	76	76	—	Red	—	24						
		76		—	Red	—								
		625	84	80	—	Red	—	20						
		76		—	Red	—								
		1250	84	84	—	i	+	16						
		84		—	i	+								
		2500	76	76	—	i	+	24						
		76		—	i	+								
		5000	84	88	—	Red	+	12						
		92		—	Red	+								
		PC	/					99	99	—	Red	—	1	
		99							—	Red	—			
Concentration of 50% cell growth inhibition			over 5000 μ g/mL					74	74	—	Red	—	26	
								74		—	Red	—		
								74	74	—	i	+	26	
								74		—	i	+		
								74	74	—	i	+	26	
								74		—	i	+		
								99	87	—	Red	+	13	
								74		—	Red	+		
								74	87	—	Red	—	13	
								99		—	Red	—		

Time(h): Treatment hours · Hours of incubation without test article.

NT: Non Treatment

SC: Solvent Control, DMSO

PC: Positive Control, Cyclophosphamide, 15 μ g/mL

Measured value a): One petri dish in the solvent control group was regarded as a control (100%).

Observation b): Results of observation of plate at the end of incubation of cell culture.

—: Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

c): Red was red~orange red colored.

i : Deep orange

d): Presence or absence of deposition of precipitates/crystals.

—: There was no deposition of precipitates/crystals.

+: Deposition of crystals was observed.

Inhibition ratio (%) When mean of measured value exceeded 100%, inhibition ratio was regarded as 0%.

Table 1-2 Results of Chromosomal Aberration Study <+ 6-18>

(Results are shown in the right panel of Figure 1)

Study Number : M-1098

S9 mix	Time(h)	Conc (μ g/mL)	Cells observed	Polyploidy cells (%)	Judge	Number of aberration (%)							Judge	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other	TA		
+	6-18	NT	200	0.0		0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5		95-1 16-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		SC	200	0.0		0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0		21-1 10-1
			(100)	(0)		(0)	(2)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		313	200	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	55-1 81-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		625	200	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	70-1 11-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		1250	200	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	47-1 34-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		2500	200	0.0	-	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	-	01-1 86-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		5000	200	0.0	-	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	87-1 84-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		PC	200	0.0	-	0.0	22.0	44.0	0.0	0.0	0.0	44.5	+	26-1 51-1
			(100)	(0)		(0)	(28)	(50)	(0)	(0)	(0)	(51)		
			(100)	(0)		(0)	(16)	(38)	(0)	(0)	(0)	(38)		

Time(h): Treatment hours - Hours of incubation without test article

(): number of observed.

NT: Non Treatment

SC: Solvent Control, DMSO

PC: Positive Control, Cyclophosphamide, 15 μ g/mL

g : chromosomal or chromatid gap

ctb: chromatid breaks

cte: chromatid exchange

TA : number of cells with aberrations excluding gaps

csb: chromosomal breaks

cse: chromosomal exchange

TAG : total number of cells aberrations including gaps

M-1098

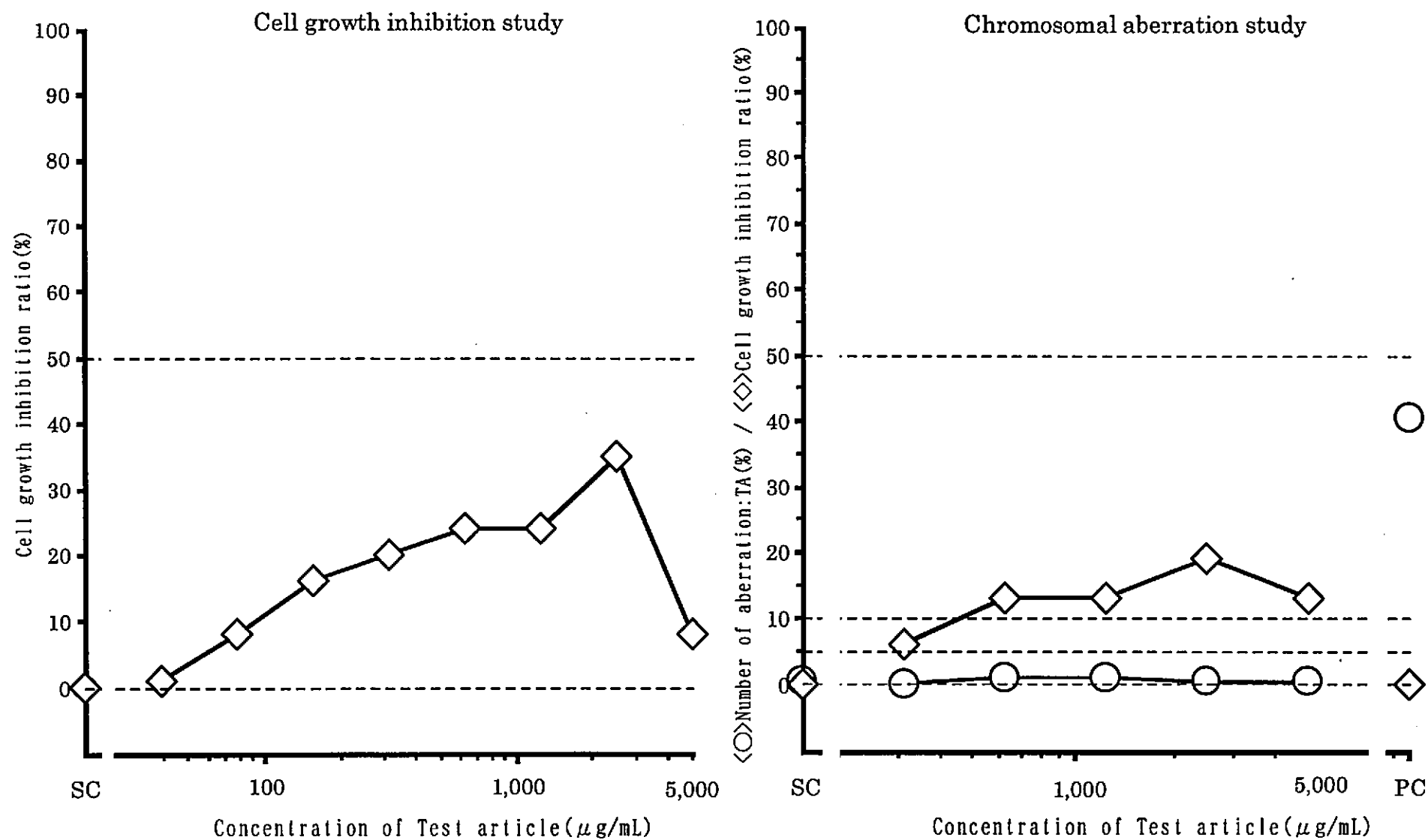


Figure 2 Results of Short-term Treatment without Metabolic Activation

Table 2-1 Cell Growth Inhibition Ratio <- 6-18>

Study type		Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell growth inhibition study (Results are shown in the left panel of Figure 2)					Chromosomal aberration study (Results are shown in the right panel of Figure 2)										
S9 mix	Time (h)		Measured value		Observation			Measured value		Observation								
			Plate 1 and 2	Mean	Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates /Crystals ^{d)}	Inhibition ratio (%)	Plate 1 and 2	Mean	Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates /Crystals ^{d)}	Inhibition ratio (%)				
6-18	Test article	NT	99 99	99	— —	Red Red	— —	—	100 87	94	— —	Red Red	— —	—				
		0 (SC)	100 ^{a)} 99	100	— —	Red Red	— —	—	100 ^{a)} 100	100	— —	Red Red	— —	—				
		39.1	99 99	99	— —	Red Red	— —	1										
		78.1	92 92	92	— —	Red Red	— —	8										
		156	84 84	84	— —	Red Red	— —	16										
		313	76 84	80	— —	Red Red	— —	20										
		625	76 76	76	— —	Red Red	— —	24										
		1250	76 76	76	— —	i i	+ +	24										
		2500	61 69	65	— —	i i	+ +	35										
		5000	92 92	92	— —	Red Red	+ +	8										
		PC																
		Concentration of			50% cell growth inhibition										over 5000 μ g/mL			

Time(h): Treatment hours · Hours of incubation without test article.

NT: Non Treatment

SC: Solvent Control, DMSO

PC: Positive Control, Mitomycin C, 0.05 μ g/mL

Measured value a): One petri dish in the solvent control group was regarded as a control (100%).

Observation b): Results of observation of plate at the end of incubation of cell culture.

-: Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

c): Red was red~orange red colored.

i : Deep orange

d): Presence or absence of deposition of precipitates/crystals.

-: There was no deposition of precipitates/crystals.

+: Deposition of crystals was observed.

Inhibition ratio (%) When mean of measured value exceeded 100%, inhibition ratio was regarded as 0%.

Table 2-2 Results of Chromosomal Aberration Study <-6-18>

(Results are shown in the right panel of Figure 2)

Study Number : M-1098

S9 mix	Time(h)	Conc (μ g/mL)	Cells observed	Polyploidy cells (%)	Judge	Number of aberration (%)							Judge	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other	TA	TAG	
-	6-18	NT	200	0.5		0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	52-1 13-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
			(100)	(0)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	
		SC	200	0.0		0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	18-1 69-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
		313	200	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15-1 96-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
		625	200	0.5	-	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	48-1 20-1
			(100)	(1)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)	
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
		1250	200	0.0	-	0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	85-1 92-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	
		2500	200	0.5	-	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	31-1 78-1
			(100)	(1)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
		5000	200	0.0	-	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	60-1 71-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	
		PC	200	0.0	-	0.0	20.5	39.5	0.0	0.0	0.0	40.5	40.5	24-1 00-1
			(100)	(0)		(0)	(21)	(36)	(0)	(0)	(0)	(36)	(36)	
			(100)	(0)		(0)	(20)	(43)	(0)	(0)	(0)	(45)	(45)	

Time(h): Treatment hours - Hours of incubation without test article (): number of observed.
 SC: Solvent Control,DMSO
 ctb: chromatid breaks
 csb: chromosomal breaks
 PC: Positive Control,Mitomycin C,0.05 μ g/mL
 cte: chromatid exchange
 cse: chromosomal exchange

NT: Non Treatment
 g : chromosomal or chromatid gap
 TA : number of cells with aberrations excluding gaps
 TAG : total number of cells aberrations including gaps

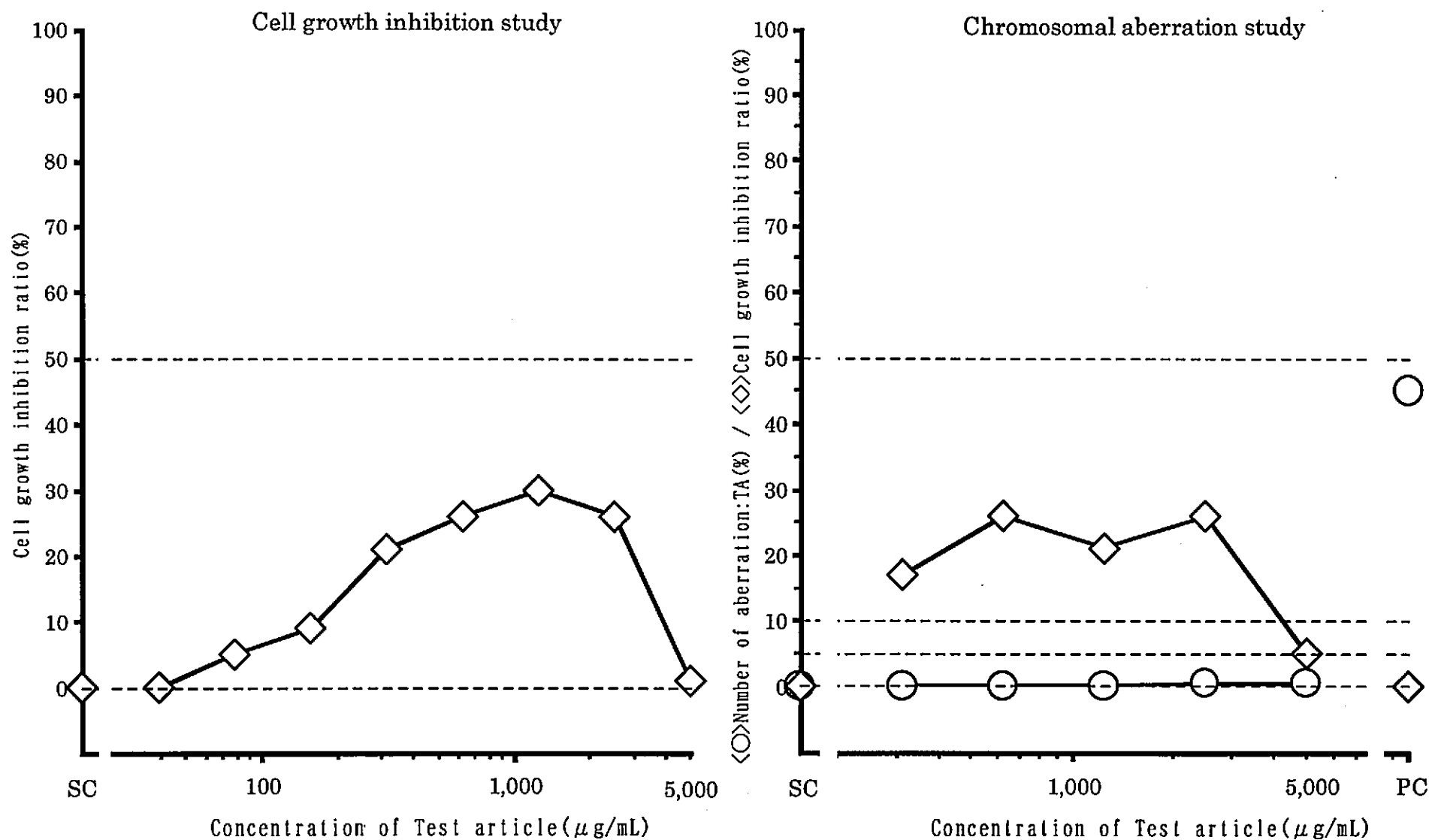


Figure 3 Results of 24-hour Continuous Treatment

Table 3-1 Cell Growth Inhibition Ratio <- 24-0>

Study type		Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell growth inhibition study (Results are shown in the left panel of Figure 3)					Chromosomal aberration study (Results are shown in the right panel of Figure 3)						
S9 mix	Time (h)		Measured value Plate 1 and 2	Mean	Condition of cells ^(a)	Color of medium ^(c)	Precipitates /Crystals ^(d)	Inhibition ratio (%)	Measured value Plate 1 and 2	Mean	Condition of cells ^(b)	Color of medium ^(c)	Precipitates /Crystals ^(d)	Inhibition ratio (%)
- 24-0	Test article	NT	99 99	99	—	Red	—	—	108 108	108	—	Red	—	—
		0 (SC)	100 ⁽ⁿ⁾ 99	100	—	Red	—	—	100 ⁽ⁿ⁾ 99	100	—	Red	—	—
		39.1	99 108	104	—	Red	—	0	/					
		78.1	91 99	95	—	Red	—	5						
		156	91 91	91	—	Red	—	9						
		313	74 83	79	—	Red	—	21						
		625	74 74	74	—	Red	—	26						
		1250	74 66	70	—	i	+	30						
		2500	74 74	74	—	i	+	26						
		5000	99 99	99	—	Red	+	1						
		PC	/						83 83	83	—	Red	—	17
		74 74							74	—	Red	—	26	
		/						83 74	79	—	i	+	21	
								74 74	74	—	i	+	26	
		/						99 91	95	—	Red	+	5	
								108 108	108	—	Red	—	0	

Concentration of	50% cell growth inhibition	over 5000 μ g/mL
------------------	----------------------------	----------------------

Concentration of 50% cell growth inhibition over 5000 μ g/mL

Time(h): Treatment hours - Hours of incubation without test article.

NT: Non Treatment

SC: Solvent Control, DMSO

PC: Positive Control, Mitomycin C, 0.05 μ g/mL

Measured value a): One petri dish in the solvent control group was regarded as a control (100%).

Observation b): Results of observation of plate at the end of incubation of cell culture.

-: Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

c): Red was red~orange red colored.

i : Deep orange

d): Presence or absence of deposition of precipitates/crystals.

-: There was no deposition of precipitates/crystals.

+ : Deposition of crystals was observed.

Inhibition ratio (%) When mean of measured value exceeded 100%, inhibition ratio was regarded as 0%.

Table 3-2 Results of Chromosomal Aberration Study <- 24-0>

(Results are shown in the right panel of Figure 3)

Study Number : M-1098

S9 mix	Time(h)	Conc (μ g/mL)	Cells observed	Polyploidy cells (%)	Judge	Number of aberration (%)							Judge	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other	TA	TAG	
-	24-0	NT	200	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	46-1 61-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
		SC	200	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	40-1 05-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
		313	200	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	79-1 76-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
		625	200	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	44-1 36-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
		1250	200	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	83-1 82-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
		2500	200	0.0	-	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	54-1 25-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
		5000	200	0.0	-	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	56-1 38-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	
		PC	200	0.0	-	0.0	17.5	44.0	0.0	0.0	0.0	45.0	45.0	59-1 22-1
			(100)	(0)		(0)	(20)	(48)	(0)	(0)	(0)	(48)	(48)	
			(100)	(0)		(0)	(15)	(40)	(0)	(0)	(0)	(42)	(42)	

Time(h): Treatment hours · Hours of incubation without test article

(): number of observed.

NT: Non Treatment

SC: Solvent Control,DMSO

PC: Positive Control,Mitomycin C,0.05 μ g/mL

g : chromosomal or chromatid gap

ctb: chromatid breaks

cte: chromatid exchange

T A : number of cells with aberrations excluding gaps

csb: chromosomal breaks

cse: chromosomal exchange

TAG : total number of cells aberrations including gaps

M-1098

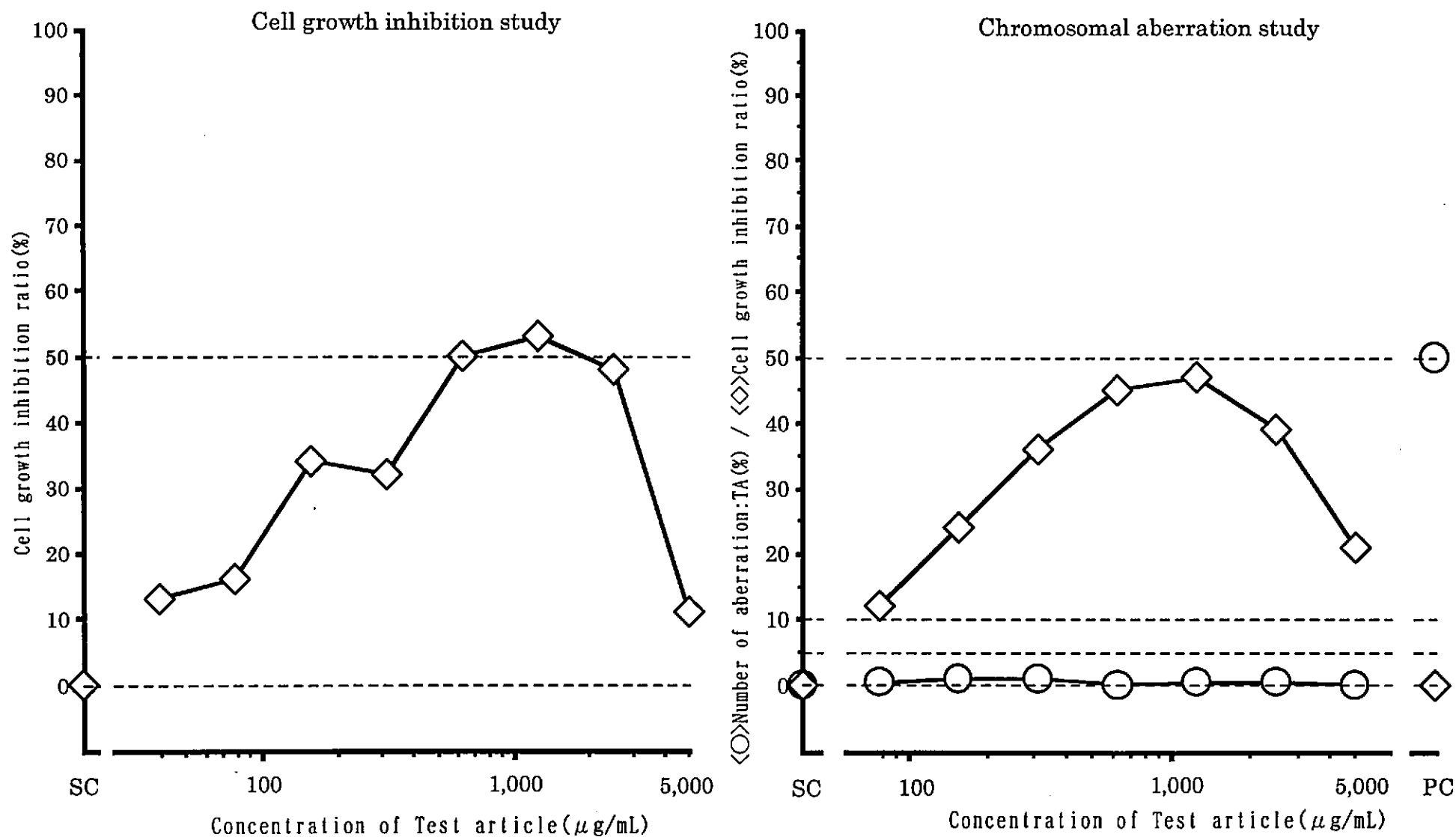


Figure 4 Results of 48-hour Continuous Treatment

Table 4-1 Cell Growth Inhibition Ratio <- 48-0>

Study type		Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell growth inhibition study (Results are shown in the left panel of Figure 4)					Chromosomal aberration study (Results are shown in the right panel of Figure 4)				
S9 mix	Time (h)		Measured value		Observation		Inhibition ratio (%)	Measured value		Observation		Inhibition ratio (%)
			Plate 1 and 2	Mean	Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}		Plate 1 and 2	Mean	Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	
- 48-0	Test article	NT	99	99	-	Red	-	105	102	-	Red	-
			99		-	Red	-	99		-	Red	-
		0 (SC)	100 ^{a)}	100	-	Red	-	100 ^{a)}	103	-	Red	-
			99		-	Red	-	105		-	Red	-
		39.1	84	87	-	Red	13					
			89		-	Red						
		78.1	84	84	-	Red	16	88	88	-	Red	12
			84		-	Red		88		-	Red	
		156	68	66	-	Red	34	76	76	-	Red	24
			63		-	Red		76		-	Red	
		313	68	68	-	Red	32	64	64	-	Red	36
			68		-	Red		64		-	Red	
		625	47	50	-	Red	50	52	55	-	Red	45
			52		-	Red		58		-	Red	
		1250	47	47	-	i	53	58	53	-	i	47
			47		-	i		47		-	i	
		2500	52	52	-	i	48	64	61	-	i	39
			52		-	i		58		-	i	
		5000	89	89	-	Red	11	88	79	-	Red	21
			89		-	Red		70		-	Red	
		PC						117	111	-	Red	0
								105		-	Red	

Concentration of 50% cell growth inhibition about 625 μ g/mL

Time(h): Treatment hours · Hours of incubation without test article.

NT: Non Treatment

SC: Solvent Control, DMSO

PC: Positive Control, Mitomycin C, 0.05 μ g/mL

Measured value a): One petri dish in the solvent control group was regarded as a control (100%).

Observation b): Results of observation of plate at the end of incubation of cell culture.

-: Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

c): Red was red~orange red colored.

i : Deep orange

d): Presence or absence of deposition of precipitates/crystals.

-: There was no deposition of precipitates/crystals.

+: Deposition of crystals was observed.

Inhibition ratio (%) When mean of measured value exceeded 100%, inhibition ratio was regarded as 0%.

Table 4-2 Results of Chromosomal Aberration Study <- 48-0>

(Results are shown in the right panel of Figure 4)

Study Number : M-1098

S9 mix	Time(h)	Conc (μ g/mL)	Cells observed	Polyploidy cells (%)	Judge	Number of aberration (%)							Judge	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other	TA		
- 48-0	NT		200	0.0		0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5		75-1 88-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
	SC		200	0.5		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		67-1 03-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
	78.1		200	0.0	-	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	-	80-1 12-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
	156		200	0.0	-	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0	-	99-1 29-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)		
	313		200	0.5	-	0.5	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0	-	45-1 41-1
			(100)	(1)		(0)	(2)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)		
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
	625		200	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	90-1 14-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
	1250		200	0.0	-	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	-	74-1 28-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
	2500		200	0.5	-	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	-	37-1 39-1
			(100)	(1)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
	5000		200	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	23-1 63-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
	PC		200	0.0	-	0.5	24.0	49.0	0.0	0.0	0.0	50.0	+	91-1 04-1
			(100)	(0)		(1)	(27)	(54)	(0)	(0)	(0)	(55)		
			(100)	(0)		(0)	(21)	(44)	(0)	(0)	(0)	(45)		

Time(h): Treatment hours · Hours of incubation without test article (): number of observed.

SC: Solvent Control, DMSO

ctb: chromatid breaks

csb: chromosomal breaks

TOX: Cell toxicity, which might have adversely affected chromosome analysis, was observed.

PC: Positive Control, Mitomycin C, 0.05 μ g/mL

cte: chromatid exchange

cse: chromosomal exchange

NT: Non Treatment

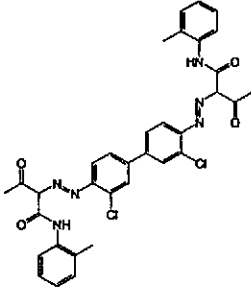
g : chromosomal or chromatid gap

TA : number of cells with aberrations excluding gaps

TAG : total number of cells aberrations including gaps

ほ乳類を用いる染色体異常試験結果報告書

1. 一般的事項

被 験 物 質 の 名 称	ピグメントエロー-14					
別 名	ベンジジンエロー					
構 造 式 又 は 示 性 式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)	 $\text{C}_{34}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_4$					
試 験 に 供 し た 被 験 物 質 の 純 度	不明		試 験 に 供 し た 被 験 物 質 の Lot No.		[REDACTED]	
不純物の名称及び濃度	不明 (乾燥減量: 0.36wt%、強熱残分: 11.8 wt%)					
C A S 番 号	5468-75-7		蒸 気 圧		—	
分 子 量	657.55		分 配 係 数		—	
融 点	—		常 温 に お け る 性 状		やまぶき色粉末	
沸 点	—					
安 定 性	冷暗所で安定					
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	水	—	—	DMSO	—	—
	アセトン	—	—	その他 ()	—	—

〔備考〕 物理化学的性状は参考資料であるので、可能な限り記入すること。

1. 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
2. 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
3. 「分配係数」の欄には、分配係数、測定濃度及び分配係数の測定に用いた溶媒名を記入すること。
4. 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

2. 細胞の種類－培養条件

細胞名	CHL/TU	入手先		ヒューマンサイエンス 研究資源バンク
種	チャイニーズハムスター 肺由来線維芽細胞	入手年月日		1997年 10月 22日
培養液	10%仔牛血清含有 Eagle's MEM 培養液	製造元		Life Technologies INC.
血清の種類と添加量	仔牛血清 10%	製造元 (Lot No.)		Life Technologies INC. (1060198)
細胞周期	17.5 h	凍結条件		10%DMSO 含有 液体窒素凍結
継代数	細胞増殖抑制試験:3、 短時間処理:14、連続処理:19	培養 条件	容器	φ60mm ガンマ線滅菌済 プラスチックシャーレ
染色体数	25 本		温度	37±0.5℃
(モード)			CO ₂ 濃度	5.0±1.0%
備考				

3. S9 mix

(1) S9の入手方法等 (該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。)

自製・購入の別	1. 自製 (2). 購入 (製造元 オリエンタル酵母工業株式会社)
製造年月日	2000年9月 1日製造 (S9) 2000年9月 8日製造 (コファクターC)
購入の場合の Lot No.	00090106 (S9) C00090804 (コファクターC)
保存温度	約-80℃

(2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・SD系	名 称	・7α/β ビタミン ・5,6-ベンゾフラノン
性	雄	投与 方 法	腹腔内投与
週 令	7 週	投与期間及び投与量 (g / kg 体重)	・7α/β ビタミン 4日間: 0.03+0.06+0.06+0.06 ・5,6-ベンゾフラノン 1日間: 0.08
体 重	216.2±7.6 g		

(3) S9 mixの組成

成 分	S9 mix 1ml 中の量	成 分	S9 mix 1ml 中の量
S 9	0.3ml	N A D P	4.0μmol
M g C l ₂	5.0μmol	HEPES 緩衝液 (pH7.2)	4.0μmol
K C l	33.0μmol	その他 ()	
グルコース-6-リン酸	5.0μmol		

(4) S9 mixの処理条件 (該当する番号を○で囲み、必要事項を記入すること。)

① プレート法 2. 浮遊細胞法 3. その他 ()	
S 9 量 (最 終 濃 度)	5%
S 9 蛋白量 (最 終 濃 度)	1.10mg/ml
処 理 時 間	6 h
回 復 時 間	18 h
備 考	

5. 短時間処理法における試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		2000 年 12 月 8 日から 2000 年 12 月 14 日	2000 年 12 月 8 日から 2000 年 12 月 14 日
培 養 器	形 状	シャーレ	シャーレ
	大 き さ	φ 60mm	φ 60mm
	培 養 液 量	4.950ml/培養器	4.117ml/培養器
	用量当たりの培養器数	2 枚	2 枚
細 胞	播 種 細 胞 数	4×10 ³ 個/ml	4×10 ³ 個/ml
	前 培 養 日 数	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被 験 物 質 溶 液 添 加 量	0.050ml/培養器	0.050ml/培養器
	S 9 m i x 添 加 量		0.833ml/培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		5%
	S 9 蛋 白 の 最 終 濃 度		1.10mg/ml
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
細胞増殖抑制 測定法	単層培養細胞密度計(モノセレータ)による		
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

代謝活性化法によらない場合 (6-18 h)		代謝活性化法による場合 (6-18 h)	
用量 (mg / ml)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg / ml)	細胞増殖率 (%)
非処理	99	非処理	99
0 (陰性対照)	100	0 (陰性対照)	100
0.0391	99	0.0391	96
0.0781	92	0.0781	92
0.156	84	0.156	84
0.313	80	0.313	76
0.625	76	0.625	80
1.25	76*	1.25	84*
2.50	65*	2.50	76*
5.00	92*	5.00	88*

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

細胞増殖率は溶媒処理群を 100% とし、濃度の低い順に記録すること。

*: シャーレ底面に析出物が観察された。

(3) 染色体異常試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		2001年 1月 15日から 2001年 2月 5日	2001年 1月 15日から 2001年 2月 5日
培 養 器	形 状	シャーレ	シャーレ
	大 き さ	φ60mm	φ60mm
	培 養 液 量	4.950ml/培養器	4.117ml/培養器
	用量当たりの培養器数	4 枚	4 枚
細 胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個/ml	4×10^3 個/ml
	前 培 養 日 数	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.050ml/培養器	0.050ml/培養器
	S 9 m i x 添加量		0.833ml/培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		5%
	S 9 蛋白の最終濃度		1.10mg/ml
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
備考			

(4) 染色体異常試験結果（別表 1 による。）

6. 連続処理法による試験（短時間処理法による試験で陰性と判定された場合に試験を実施すること。）

（1）細胞増殖抑制試験の条件

試験実施期間		2000 年 12 月 8 日から 2000 年 12 月 14 日	2000 年 12 月 8 日から 2000 年 12 月 14 日
培 養 器	形 状	シャーレ	シャーレ
	大 き さ	φ60mm	φ60mm
	培 養 液 量	4.950ml/培養器	4.950ml/培養器
	用量当たりの培養器数	2 枚	2 枚
細 胞	播 種 細 胞 数	4×10 ³ 個/ml	4×10 ³ 個/ml
	前 培 養 日 数	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被 験 物 質 溶 液 添 加 量	0.050ml/培養器	0.050ml/培養器
	処 理 時 間	24h	48h
	回 復 時 間	0h	0h
細胞増殖抑制 測定法	単層培養細胞密度計(モノセレータ)による		
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

(24-0h) 処理による場合		(48-0h) 処理による場合	
用量 (mg/ml)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/ml)	細胞増殖率 (%)
非処理	99	非処理	99
0 (陰性対照)	100	0 (陰性対照)	100
0.0391	104	0.0391	87
0.0781	95	0.0781	84
0.156	91	0.156	66
0.313	79	0.313	68
0.625	74	0.625	50
1.25	70*	1.25	47*
2.50	74*	2.50	52*
5.00	99*	5.00	89*

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

連続処理法は代謝活性化法によらない方法による。

細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、濃度の低い順に記録すること。

*: シャーレ底面に析出物が観察された。

(3) 染色体異常試験の条件

試験実施期間		2001 年 2 月 3 日から 2001 年 2 月 26 日	2001 年 2 月 3 日から 2001 年 2 月 26 日
培 養 器	形 状	シャーレ	シャーレ
	大 き さ	φ 60mm	φ 60mm
	培 養 液 量	4.950ml/培養器	4.950ml/培養器
	用量当たりの培養器数	4 枚	4 枚
細 胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個/ml	4×10^3 個/ml
	前 培 養 日 数	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被 験 物 質 溶 液 添 加 量	0.050ml/培養器	0.050ml/培養器
	処 理 時 間	24h	48h
	回 復 時 間	0h	0h
備考			

(4) 染色体異常試験結果 (別表 2 による。)

7. 結果の判定及び参考事項

(1) 結果の判定

判 定		陽 性				陰 性	
(いずれかを○で囲むこと。)							
判定の理由							
代謝活性化の有無及び処理時間に関わらず、ピグメントエロー-14 のいずれの処理系列においても、細胞毒性の発現濃度域を含む全用量群において染色体の構造異常を有する細胞及び倍数性細胞の 5% を越える出現頻度の増加は認められず、また用量依存的な増加も認められなかった。このとき染色体の観察を行った 2 枚の培養器(シャーレ)間に異常細胞の出現頻度の著しい相違は認められず、培養条件などの試験環境においても異常は認められなかった。なお、いずれの処理方法においても染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 5%未満、陽性対照群では 10%以上の増加が認められ、試験は適切に実施されたことが確認された。							
以上の結果により、本試験条件下におけるピグメントエロー-14 の染色体異常誘発能は陰性であると判定した。							
D ₂₀ 値	構造異常	短時間処理法	-S9 mix	—	h 処理	mg/ml	
			+S9 mix	—	h 処理	mg/ml	
		連続処理法		—	h 処理	mg/ml	
				—	h 処理	mg/ml	
	数的異常	短時間処理法	-S9 mix	—	h 処理	mg/ml	
			+S9 mix	—	h 処理	mg/ml	
		連続処理法		—	h 処理	mg/ml	
				—	h 処理	mg/ml	

[備考] D₂₀ 値は分裂中期像 20 % に異常を誘発させるために必要な被験物質の推定用量であり、陽性と判断した試験系列について、異常のタイプ別に記入すること。

(2) 参考事項

特筆事項無し

[備考] 「参考事項」の欄には、試験結果に対する試験責任者の見解等を記入すること。

8. その他

試験実施施設	名 称	株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所		
	所 在 地	静岡県御殿場市かまど 1284		電話 0550(82)2000 FAX 0550(82)2379
試験実施期間 中の試験責任 者	職 氏 名	[REDACTED]		
	経験年数	[REDACTED]		
試験終了後の 試験責任者	職 氏 名	[REDACTED]		
試験番号	M-1098			
試験期間	2000 年 12 月 6 日 より 2001 年 6 月 14 日			

【備考】

1. 本様式への記載は最終報告書より転記して記載すること。
2. 最終報告書と同じ試験番号を記載すること。

別表1 染色体異常試験の結果（短時間処理法）

被験物質の名称 ビグメントエロー-14

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質 の用量 (ng/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
			観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	そ の 他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍 数 体	そ の 他	総異常細胞数 (%)
6-18	-	非処理	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	1	0	1
			100	1	1	0	0	0	1	0	87	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(94)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6-18	-	陰性対照 (DMSO)	100	1	1	0	0	0	1	0	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(100)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	0.313	100	0	0	0	0	0	0	0	87	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(94)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	0.625	100	1	1	0	0	0	2	0	87	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0	87	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	(87)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6-18	-	1.25 †	100	1	1	0	0	0	1	0	87	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	87	100	0	0	0
			200	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	(87)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	2.50 †	100	1	1	0	0	0	1	0	87	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0	74	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(81)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6-18	-	5.00 †	100	0	0	0	0	0	0	0	87	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	87	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(87)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	陽性対照 (MMC)	100	21	36	0	0	0	36	0	100	100	0	0	0
			100	20	43	0	0	0	45	0	100	100	0	0	0
			200	41 (20.5)	79 (39.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	81 (40.5)	0 (0.0)	(100)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

【備考】

1. 処理時間の欄には、処理時間－回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合は、その用量に†印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にT O Xを記入すること。
7. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記載すること。

DMSO: ジメチルスルホキシド

MMC: マイトマイシン C

別表1 染色体異常試験の結果（短時間処理法）

被験物質の名称 ビグメントエロー14

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の致死的異常の細胞数 (出現頻度%)			
			観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍 数 体	その他	総異常細胞数 (%)
6-18	+	非処理	100	1	1	0	0	0	1	0	99	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(99)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	陰性対照 (DMSO)	100	2	1	0	0	0	2	0	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	0
			200	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	(100)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	0.313	100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(99)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	0.625	100	0	0	0	0	0	0	0	74	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	74	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(74)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	1.25 †	100	0	0	0	0	0	0	0	74	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	74	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(74)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	2.50 †	100	1	0	0	0	0	1	0	74	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	74	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(74)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	5.00 †	100	1	0	0	0	0	1	0	99	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	74	100	0	0	0
			200	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	(87)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	陽性対照 (CP)	100	28	50	0	0	0	51	0	74	100	0	0	0
			100	16	38	0	0	0	38	0	99	100	0	0	0
			200	44 (22.0)	88 (44.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	89 (44.5)	0 (0.0)	(87)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

[備考]

1. 処理時間の欄には、処理時間－回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合は、その用量に†印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にTOXを記入すること。
7. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記述すること。

DMSO: ジメチルスルホキシド

CP: シクロフォスファミド

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。

別表2 染色体異常試験の結果（連続処理法）

被験物質の名称 ビグメントエロー-14

処理時間 (h)	被験物質 の用量 (ng/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
		観察細胞数	染色体体切断	染色体体交換	染色体切断	染色体交換	そ の 他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍 数 体	そ の 他	総異常細胞数 (%)
24-0	非処理	100	0	0	0	0	0	0	0	108	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	108	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(108)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(100)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	0.313	100	0	0	0	0	0	0	0	83	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	83	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(83)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	0.625	100	0	0	0	0	0	0	0	74	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	74	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(74)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	1.25 †	100	0	0	0	0	0	0	0	83	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	74	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(79)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	2.50 †	100	1	1	0	0	0	1	0	74	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	74	100	0	0	0
		200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(74)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	5.00 †	100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	0
		100	0	1	0	0	0	1	0	91	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(95)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	陽性対照 (MMC)	100	20	48	0	0	0	48	0	108	100	0	0	0
		100	15	40	0	0	0	42	0	108	100	0	0	0
		200	35 (17.5)	88 (44.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	90 (45.0)	0 (0.0)	(108)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

【備考】

1. 処理時間の欄には、処理時間－回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合は、その用量に†印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にT O Xを記入すること。
7. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記載すること。

DMSO: ジメチルスルホキシド

MMC: マイトマイシン C

別表2 染色体異常試験の結果（連続処理法）

被験物質の名称 ビグメントエロー-14

処理時間 (h)	被験物質 の用量 (ng/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
		観察細胞数	染色体体切断	染色体体交換	染色体切断	染色体交換	そ の 他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍 数 体	そ の 他	総異常細胞数 (%)
48-0	非処理	100	1	0	0	0	0	1	0	105	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	0
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(102)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48-0	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0	105	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(103)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
48-0	0.0781	100	0	1	0	0	0	1	0	88	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	88	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(88)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48-0	0.156	100	1	0	0	0	0	1	0	76	100	0	0	0
		100	0	1	0	0	0	1	0	76	100	0	0	0
		200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	(76)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48-0	0.313	100	2	1	0	0	0	2	0	64	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	1	64	100	0	0	0
		200	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	1 (0.5)	(64)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
48-0	0.625	100	0	0	0	0	0	0	0	52	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	58	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(55)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48-0	1.25 †	100	1	1	0	0	0	1	0	58	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	47	100	0	0	0
		200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(53)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48-0	2.50 †	100	1	1	0	0	0	1	0	64	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0	58	100	0	0	0
		200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(61)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
48-0	5.00 †	100	0	0	0	0	0	0	0	88	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	70	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(79)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48-0	陽性対照 (MMC)	100	27	54	0	0	0	55	1	117	100	0	0	0
		100	21	44	0	0	0	45	0	105	100	0	0	0
		200	48 (24.0)	98 (49.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	100 (50.0)	1 (0.5)	(111)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

【備考】

1. 処理時間の欄には、処理時間－回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の折出が認められた場合は、その用量に†印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にT O Xを記入すること。
7. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記載すること。

DMSO: ジメチルスルホキシド

MMC: マイトマイシン C

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。

GENETIC TOXICITY IN VITRO (NON-BACTERIAL IN VITRO TEST)

TEST SUBSTANCE

- **Identity:** Pigment Yellow 14 (CAS No. 5468-75-7)
- **Remarks:** Synonym: Benzidine Yellow
Source: [REDACTED], Lot No. [REDACTED] wavelength of maximum absorption at 421.5 nm, molar absorptivity 915.
Impurity: loss on drying 0.36 wt%, residue on ignition 11.8 wt%. Kept in a refrigerator until use.

METHOD

- **Method/guideline:** OECD TG 473
- **Test type:** Chromosomal aberration test
- **GLP:** Yes
- **Year:** 2001
- **Species/Strain:** CHL/IU cell
- **Metabolic activation:** With and without S9 from rat liver, induced by phenobarbital and 5,6-benzoflavone.
- **Statistical method:** No statistical analysis was done.

REMARKS FIELD FOR TEST CONDITIONS

- **Study Design** For continuous treatment, cells were treated for 24 or 48 hrs without S9. For short-term treatment, cells were treated for 6 hrs with and without S9 and cultivated with fresh media for 18 hrs.
- **Concentration:** -S9 (Short-term treatment): 313, 625, 1250, 2500 and 5000 µg/mL
+S9 (Short-term treatment): 313, 625, 1250, 2500 and 5000 µg/mL
-S9 (24h continuous treatment): 313, 625, 1250, 2500 and 5000 µg/mL
-S9 (48h continuous treatment): 78.1 156, 313, 625, 1250, 2500 and 5000 µg/mL
- **Plates/test:** 2
- **Solvent:** Dimethylsulfoxide (DMSO)
- **Positive controls:**
 - Mitomycin C used for short-term and continuous treatment without metabolic activation.
 - Cyclophosphamide used for short-term treatment with metabolic activation

RESULTS

- **Cytotoxic concentration:**
Toxicity of more than 50% cell growth inhibition was not observed up to 5000µg/mL in the chromosomal aberration study, irrespective of short-term or continuous treatment or the presence or absence metabolic activation.

- **Genotoxic effects:**

With metabolic activation	Clastogenicity: Negative
	Polyploidy: Negative
Without metabolic activation:	Clastogenicity: Negative
	Polyploidy: Negative

REMARKS FIELD FOR RESULTS CONCLUSIONS

Chromosomal aberration in CHL/IU cells is negative with and without metabolic activation.

DATA QUALITY

- **Reliability:** Valid without restriction

Remarks field for Data Reliability

Well-conducted study, carried out by BOZO Research Center Inc. (Japan)

REFERENCES (Free Text)

- Ishidate, M. Jr. and Odashima, S.: Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro – A screening for chemical carcinogens, *Mutation Res.*, 48, 337-354(1977)
- Matsuoka, A., et al.: Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro, *Mutation Res.*, 66, 277-290(1979)
- Ishidate, M.: Screening Trial to Detect Possible Chemical Mutagens and/or Carcinogens in the Environment — Mammalian Cell Systems, *Journal of the Japan Cosmetic Science Association*, 6, 31-43 (1982)
- Ishidate, M.: Chromosomal Aberration Test Data, LIC Inc. (1987)
- M. Ishidate, Jr., Edited by G. Obe and A. T. Natarajan: Chromosomal Aberrations Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-271(1989)
- JPMA: Q&A of Mutagenicity Tests in accordance with Toxicity Study Guidelines of Pharmaceuticals from the Ministry of Health and Welfare, Scientist Inc. (1992)
- Toshio Sofuni: *IN VITRO DETECTION OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS*, *In Vitro Methods of Toxicology*, CRC Press, 203-216(1992)

GENERAL REMARKS

None